تعیین تجربی زبری سطح سلول سرطانی HT29 با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی در جهت کاربرد در نانومنیپولیشن *

(یادداشت پژوهشی)

محرم حبیب نژاد کورایم[۱] هدیه بادکوبه هزاوه[۲] معین طاهری[۳]

چکیده *در این مقاله زبری سطح سلول سرطانی HT29 با استفاده از تحلیل تصاویر توپوگرافی به‌دست آمده توسط میکروسکوپ نیروی اتمی تعیین شده است. بر مبنای نتایج آنالیز زبری انجام‌شده و معادلات تئوری زبری رابینوویچ، شعاع متوسط برجستگی‌های سطح نمونه و سطح مبنا تعیین شده است. این مقادیر در روابط مدل دینامیک منیپولشن ذرات زبر وارد شده و مقادیر نیرو و زمان بحرانی منیپولیشن سلول‌ها شبیه‌سازی شده است. برمبنای نتایج، مد غلتشی مد غالب در شروع به حرکت سلول است و تحلیل برمبنای مدل رابینوویچ نسبت به مدل رامپ مقادیر نیرو و زمان بحرانی کمتری را پیش‌بینی می‌کند.*

واژه‌های کلیدی زبری سطح; سلول سرطانی HT29 ; میکروسکوپ نیروی اتمی; نانومنیپولیشن.

Experimental Determination of HT29 Cancerous Cell Surface Roughness by Atomic Force Microscopy to be Applied in Nanomanipulation

M. Habibnejad Korayem H. Badkoobeh Hezaveh M. Taheri

Abstract *In this paper, surface roughness of HT29 cancerous is determined using topography images obtained by Atimic Force Microscopy (AFM). The mean radiuses of cell and substrate surface asperities are determined, based on results of conducted roughness analysis and Rabinovich roughness theory. These values have been applied in the equations of rough particle nanomanipulation dynamic model and the amounts of critical force and time are simulated. Based on results, the rolling mode is the dominant dynamic mode at the onset of cells movement and the analysis based on rabinovich model predict lower amounts of critical force and time compared to Rumpf model based analysis.*

Key Words Surface roughness; HT29 cancerous cell; Atomic Force Microscopy; Nanomanipulation.

✶تاریخ دریافت مقاله ۹٤/۸/۲۰ و تاریخ پذیرش آن ۹٤/۱۲/۱۲ می‌باشد. DOI: 10.22067/fum-mech.v28i1.40826

(۱) استاد، قطب علمی مکانیک جامدات تجربی و دینامیک، دانشکدهٔ مهندسی مکانیک، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران.

(۲) کارشناسی ارشد، مهندسی مکانیک، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران.

(۳) نویسندهٔ مسئول: استادیار، گروه مهندسی مکانیک، دانشکدهٔ فنی مهندسی، دانشگاه اراک. m-taheri@araku.ac.ir

مقدمه

یکی از مشخصه‌هایی که در شناسایی نانوذرات زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرد، زبری سطح آنها می‌باشد. این مشخصه به‌عنوان یک شناسهٔ بسیار جالب وضعیت سلامتی سلول مطرح می‌باشد [1]. زبری سطح غشای سلول‌ها قبل و بعد از فرآیندهای سطحی سلولی مانند ترکیب با آنتی بادی‌ها با تغییر در ترکیب شیمیایی غشای سلولی تغییر می‌کند. برای مثال افزایش زبری سطح غشای سلول نشان از ترکیب موفق سلول با آنتی بادی‌ها دارد. هم‌چنین بررسی زبری سطح سلول در یک دورهٔ زمانی مشخص می‌تواند مشخص کنندهٔ اتصال یا ورود نانوذرات دارویی به غشای سلول هدف در فرآیندهای دریافت دارویی در ابعاد سلولی باشد. بنابراین آنالیز زبری سطح غشای سلول‌ها و دیگر نمونه‌های زیستی در بسیاری از تحقیقات پزشکی و دارویی کاربرد دارد [2].

وجود مجموعهٔ متنوعی از زبری‌ها در ابعاد و اشکال مختلف برروی سطح سلول‌ها و سایر ذرات بیولوژیکی نقش بسیار مهمی در برهم‌کنش‌های میان سلول – سلول و سلول – سطح مبنا ایفا می‌کند. وضعیت هندسی و زبری سطح نانوذرات و هم‌چنین سطوح در تماس با آنها، در شرایط چسبندگی و تغییرشکل میان آنها نیز، تأثیر به‌سزایی دارد و بنابراین شرایط چسبندگی ذرات زیستی نیز در چگونگی انواع فرآیندهای سطحی مرتبط با آنها ازجمله بیومنیپولیشن نمونه‌های زیستی، دارای اهمیت بسیار قابل‌توجهی است و منظور نمودن آن در بررسی‌ها و تحقیقات دقیق در این زمینه ضرورت می‌یابد. میکروسکوپ نیروی اتمی توانایی بررسی زبری سطح غشای سلولی را با جزئیات و دقت بالا و بدون آسیب رساندن به آن، فراهم می‌کند.

مگ و همکاران [3]، در پژوهشی بیان نمودند که تغییر شکل سلول‌ها نقش بسیار مهمی در بسیاری فرآیندهای سلولی ایفا می‌کند و چسبندگی بسیار بر این امر تأثیرگذار است. سپس با اشاره به وابستگی چسبندگی میان سلول‌ها و سلول‌ها با سایر سطوح به زبری این سطوح در مقیاس کمتر از میکرون، روشی ساده و هدفمند برای مطالعهٔ میکروگراف‌های الکترونی به‌منظور تعیین زبری سطح کانتور سلول‌ها، ارائه نمودند.

کاول- قانکار و همکاران [4] در تحقیقی به اندازه‌گیری‌های متفاوت توپوگرافی و مورفولوژی سطح سلول‌ها ازجمله سلول‌های تومور سرطان سینه با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) و میکروسکوپ روبش الکترونی (SEM) پرداختند. در قسمت نتایج این پژوهش بیان شده است که اندازه‌گیری‌های زبری نشان می‌دهد که با بالا رفتن مرحلهٔ پیشرفت سرطان (از مرحلهٔ ۱ تا مرحلهٔ ۳) زبری سطح سلول‌ها در مقایسه با بافت سالم و نرمال آنها که دارای توپوگرافی سطح بسیار هموارتری می‌باشند، افزایش می‌یابد.

در تحقیق دیگری آنتونیو و همکاران [1]، اشاره نمودند که اندازه‌گیری‌های زبری با استفاده از AFM دارای وابستگی ابعادی می‌باشد؛ به این معنی که به پارامترهای اندازه‌گیری از جمله ناحیهٔ اسکن‌شده و اندازهٔ گام (step size) بسیار بستگی دارد. در این پژوهش اعلام شده که کاهش وابستگی ابعادی مقدار زبری با استفاده از تکنیک‌های فیلتر نمودن اطلاعات که در ابعاد نانو استاندارد نشده‌اند و به‌ویژه برای ذرات بیولوژیکی قابل انجام است. در این تحقیق محققان روش جدیدی برمبنای تغییرات مقادیر برخی پارامترهای زبری سطح (مانند ریشهٔ میانگین مربعات زبری (root mean square roughness) و کجی (skewness) به‌عنوان تابع فیلتر فرکانس‌ها برای استفاده در جهت بهینه‌سازی فرآیند فیلتر نمودن داده‌ها در محاسبهٔ زبری غشای سلولی معرفی نمودند. با استفاده از نتایج به‌کارگیری روش مذکور در این تحقیق، مقدار زبری سطح غشای سلول در قالب پارامتر ریشه میانگین مربعات زبری مستقل از شکل سلول،

انحرافات ابعادی غشای سلول و شرایط و پارامترهای اندازه‌گیری به‌دست می‌آید.

از جمله دیگر فرآیندهای دینامیکی که بر روی سلول‌ها و سایر ذرات بیولوژیکی با اهدافی از قبیل شناخت خواص دینامیکی ذرات بیولوژیکی، ساخت داروها، تحقیقات برهم‌کنش‌های میان پروتئین‌ها، ژن‌ها و سلول‌های زنده در محیط‌های فیزیولوژیکی انجام می‌گیرد، فرآیند نانومنیپولیشن با استفاده از AFM می‌باشد. یکی از انواع روش‌های منیپولیشن با استفاده از پروب AFM، منیپولیشن به روش راندن بر روی سطح است. در این روش پروب با ذرهٔ هدف تماس برقرار می‌کند و آن را بر روی سطح مبنا می‌راند و با استفاده از تحلیل داده‌های دریافتی از فیدبک نیرو طی این فرآیند دینامیکی اطلاعات مفید مختلفی استخراج می‌شود و یا به این ترتیب جابه‌جایی هدفمند واحدهای میکرو/نانوذرات انجام می‌پذیرد. تاکنون تحقیقات زیادی پیرامون مدل‌سازی و چگونگی تأثیرگذاری پارامترهای مختلف محیطی و ابعادی ذره و سطح مبنا بر دینامیک این فرآیند انجام شده است.

کورایم و ذاکری [5] برمبنای اولین مدل دینامیکی ارائه‌شده برای این فرآیند با در نظر گرفتن نیروهای سطحی توسط سیتی و همکاران، با مطالعه‌ی دقیق‌تر این فرآیند مدلی به منظور آنالیز حساسیت پارامترهای نیرو و زمان بحرانی فرآیند منیپولیشن نسبت به سایر پارامترهای مستقل مؤثر بر فرآیند استخراج نمودند. در تحقیق دیگری کورایم و ذاکری [6] مدل دینامیک فرآیند راندن با استفاده از AFM برای میکرو/نانو ذرات کروی شکل برروی سطح را با در نظرگرفتن زبری برای سطح مبنا، توسعه دادند.

در این مقاله، ابتدا به‌طور مختصر به نحوهٔ آماده‌سازی نمونهٔ سلول سرطانی HT29 به‌منظور تصویربرداری با استفاده از AFM پرداخته شده است. سپس تصاویر توپوگرافی سطح به‌دست آمده با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی از سطح سلول و سطح مبنا تحلیل زبری شده و برمبنای مقادیر به‌دست آمده برای پارامتر زبری سطح ریشه میانگین مربعات زبری و روابط تئوری چسبندگی زبری رابینوویچ، شعاع متوسط برجستگی‌های سطح نمونهٔ سلول سرطانی و سطح مبنا تخمین زده شده است. سپس مقادیر عددی شعاع زبری‌ها در روابط مدل دینامیک فرآیند منیپولیشن با استفاده از AFM مورد استفاده قرار گرفته و مقادیر نیرو و زمان بحرانی منیپولیشن برای سلول سرطانی مورد مطالعه با در نظر گرفتن زبری حقیقی سطح این سلول، شبیه‌سازی شده است.

آماده‌سازی سلول سرطانی HT29 برای تصویربرداری با AFM

ردهٔ سلولی HT29 از بافت تومور سرطانی رودهٔ بزرگ انسان جداسازی شده است. این سلول‌ها از بانک ملی سلول ایران (NCBI) واقع در مؤسسهٔ پاستور ایران تهیه شده و در دمای ۳۷°C (۹۵ درصد هوا و ۵ درصد CO2) در محیط RPMI-1640 (Sigma8758) تغذیه شده با ۵ درصد سرم جنین گاوی (Gibco) و ۱ درصد پنی‌سیلین (Gibco) نگه‌داری شده است. سپس به‌منظور تصویربرداری در محیط هوا، سلول‌های کشت شده برروی سطح ثابت شده و در مد غیرتماسی میکروسکوپ نیروی اتمی از آن تصویربرداری شد. شکل (۱) تصویر نمونه سلول سرطانی HT29 ثابت‌شده برروی سطح ظرف نمونه را نشان می‌دهد.



شکل ۱ سلول سرطانی HT29 ثابت شده برروی سطح ظرف نمونه

آنالیز تجربی زبری سطح نمونهٔ زیستی و سطح مبنا

در این قسمت با استفاده از نرم‌افزار DME به آنالیز زبری سطح نمونهٔ سلول سرطانی تصویربرداری شده پرداخته شده است.

زبری سطوح حقیقی با استفاده از انحرافات یک پروفیل دوبعدی اندازه‌گیری‌شده (مقادیر ارتفاع (z) اندازه‌گیری‌شده برای یک سطح توسط میکروسکوپ نیروی اتمی) نسبت به یک سطح ایده‌آل، ارزیابی می‌شود. پارامترهای متفاوتی برای بیان زبری سطح عنوان شده و قابل اندازه‌گیری هستند. از جمله رایج‌ترین آنها در تحقیقات مختلف از نقطه‌نظر آماری شامل متوسط زبری (S_a)، ریشهٔ میانگین مربعات زبری (rms یا S_q)، کجی زبری سطح ارزیابی شده (S_{sk})، تیزی (Kurtosis) پروفیل ارزیابی‌شده (S_{ku})، ارتفاع قله – قله (S_z و S_t و S_y) و S_v به‌صورت ماکزیمم عمق فرورفتگی‌های سطح یا همان دره‌ها و S_p ماکزیمم ارتفاع برآمدگی یا همان قله‌ها می‌باشد. از میان پارامترهای متفاوت مطرح شده، یکی از پرکاربردترین و مورد توجه‌ترین آنها، به‌موجب حساسیت بالای این پارامتر به انحرافات جداشده از پروفیل مبنا، پارامتر ریشهٔ میانگین مربعات زبری (rms) می‌باشد، که معادلهٔ ارائه‌شده برای آن به‌صورت معادلهٔ (۱) می‌باشد [11].

$$R_{rms} = \sqrt{\frac{1}{m'}\sum_{1}^{m'}\left|Z_i^2\right|} \qquad (۱)$$

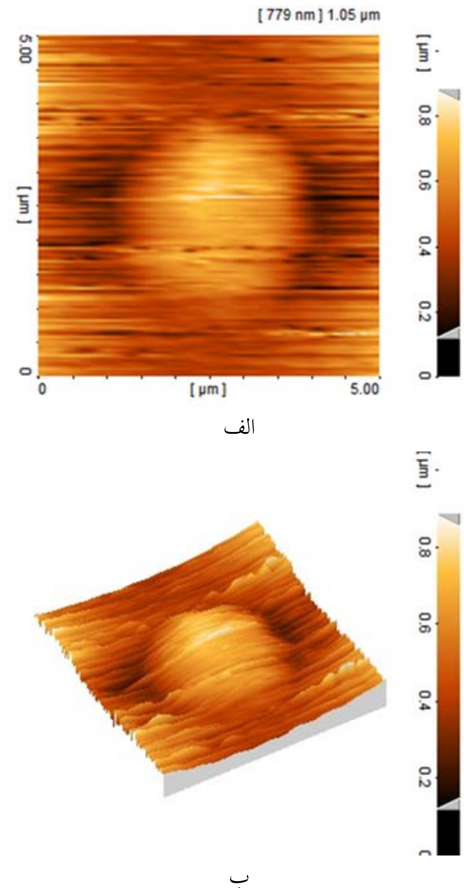
که m' تعداد نقاط داده‌ها و z_i انحراف ارتفاع نقطهٔ i ام از سطح میانگین تعریف‌شده به‌گونه‌ای که حاصل جمع حسابی تمامی ارتفاع‌ها برابر صفر می‌باشد. با هدف کاربردی‌تر کردن روابط قبلی مورد استفاده جهت محاسبهٔ نیروی چسبندگی سطوح زبر و باتوجه به آن‌که پارامتر زبری سطح rms، از داده‌های تجربی به‌دست آمده از تصویربرداری AFM قابل استخراج است؛ رابینوویچ و همکارانش، معادله‌ای بین این پارامتر و شعاع برجستگی‌های زبری و هم‌چنین ارتفاع زبری‌ها ارائه نمودند[7] . معادلات (۴-۲) به‌ترتیب معادلهٔ نیروی چسبندگی و معادلات بین پارامتر rms و شعاع برجستگی‌های زبری و هم‌چنین ارتفاع زبری‌ها ارائه شده توسط رابینوویچ و همکاران [7 ,13 ,12] می‌باشند. در معادلات سینماتیکی و دینامیکی مدل دینامیکی توسعه داده‌شده برای ذرات زبر، پارامتر شعاع برجستگی‌های سطح (شعاع و ارتفاع برجستگی در مدل توسعه داده‌شده برمبنای مدل زبری رابینوویچ) وارد می‌شود [7 ,6]. بنابراین در بررسی منیپولیشن ذرات، با استخراج پارامتر زبری سطح rms از تصاویر گرفته‌شده از سطح ذرات با استفاده از AFM و با استفاده از معادلهٔ مذکور بین این پارامتر و شعاع و ارتفاع برجستگی‌های روی سطح ذره، شرایط واقعی زبری سطح ذره مانند سایر خصوصیات مکانیکی حقیقی ذره در شبیه‌سازی فرآیند منیپولیشن وارد می‌شوند. نتایج شبیه‌سازی‌های مذکور در بخش شبیه‌سازی ارائه شده‌اند.

$$F_{Rabin.}^{ad} = \frac{A_H}{6{Z_0}^2}\left(\frac{rR}{r+R} + \frac{R}{(1+y_{\max}/Z_0)^2}\right) \qquad (۲)$$

$$r = 1.485rms \qquad (۳)$$

$$y_{\max} = 1.82rms \qquad (۴)$$

که در این معادلات r و $y_{\max}$ به‌ترتیب شعاع و ماکزیمم ارتفاع برجستگی‌های کروی شکل زبری، R شعاع ذرهٔ کروی، A_Hثابت هماکر و Z_0 فاصلهٔ جدایش می‌باشند. مقادیر پارامتر زبری rms با انتخاب مساحت برابری از سطح مبنا و سطح سلول در تصاویر خام AFM با استفاده از منوی زبری نرم‌افزار rms محاسبه شد و استخراج گردید. نمونهٔ تصویر به‌دست آمده از توپوگرافی سطح سلول و سطح مبنا با استفاده از AFM در شکل (۲) نشان داده شده است.



شکل ۲ تصویر توپوگرافی سطح سلول سرطانی HT29 و سطح مبنا (الف) دوبعدی و (ب) سه‌بعدی با استفاده از AFM در مد غیرتماسی

با بررسی تصاویر به‌دست آمده، هندسهٔ سلول مورد بررسی با تقریب بسیار خوبی کروی دیده می‌شود و بنابراین در مراحل بعدی تحقیق مدل‌های مکانیک تماس مربوط به این هندسه در مدل دینامیکی و شبیه-سازی استفاده شده است. هم‌چنین شعاع دقیق سلول با استفاده از نرم‌افزار DME ۳/۱۵۸ میکرومتر به‌دست آمد. سپس مقدار شعاع و ارتفاع برجستگی‌های سطح و سلول به‌ترتیب با استفاده از معادلات (٤ و ٣) به‌صورت معادلات (۸-۵) به‌دست می‌آیند. با توجه به آن‌که مقدار rms سطح در نواحی مختلف سطح با مقداری تفاوت به‌دست می‌آید، محاسبات زبری تعداد دفعاتی تکرار شد و میانگین مقادیر به‌دست آمده به‌عنوان rms تقریبی سطح به‌صورت زیر در نظر گرفته شد. با وارد نمودن این مقادیر شرایط حقیقی سطح نمونهٔ زیستی مد نظر برای منیپولیشن در شبیه‌سازی وارد می‌گردد.

$$r_{sub.} = 1.485 rms_{sub.} = 1.48 \times 87.3 = 129.2(nm) \quad (۵)$$

$$r_{cell} = 1.485 rms_{cell} = 1.48 \times 103.6 = 153.3(nm) \quad (٦)$$

$$y_{\max, cell} = 1.82 rms_{cell} = 1.82 \times 103.6 = 188.5(nm) \quad (۷)$$

$$y_{\max, sub.} = 1.82 rms_{sub.} = 1.82 \times 87.3 = 158.9(nm) \quad (۸)$$

مقادیر سایر پارامترهای زبری محاسبه‌شده از محدودهٔ تصویر که مربوط به سطح سلول می باشد، به شرح زیر می‌باشد:

$s_a = 87.34(nm)$ $\qquad$ $s_{sk} = 0.7$

$s_{ku} = 4.3$ $\qquad$ $s_y = 667.8(nm)$

مدل دینامیک منیپولیشن میکرو/نانو ذرات

در این بخش به‌طور مختصر به توضیح مدل دینامیک منیپولیشن میکرو/نانوذرات پرداخته شده است. در تحقیقات گذشته مدل دینامیکی فرآیند منیپولیشن به‌روش راندن با استفاده از AFM برای ذرات کروی و به‌طور محدودی برای ذرات دارای هندسه‌های غیرکروی مانند استوانه‌ای و در محیط‌های هوا و مایع ارائه شده است. هم‌چنین، شبیه‌سازی‌هایی در شرایط گوناگون ابعاد ذره، هم‌چنین در تحقیقات محدودی برای برخی ذرات زیستی هم‌چون دی ان ای و در محیط هوا، آب و برخی سیالات بیولوژیکی انجام شده است [8-10]. هم‌چنین با هدف هرچه نزدیک‌تر نمودن مدل به واقعیت و با توجه به تأثیر زیاد منظور نمودن زبری سطح در فرآیندهای دینامیکی شامل تأثیرات چسبندگی و در ابعاد نانو، کورایم و همکاران [6, 7] مدل دینامیک نانومنیپولیشن بااستفاده از AFM را ابتدا

با در نظر گرفتن زبری سطح بر روی سطح مبنا سپس با در نظر گرفتن زبری بر روی سطح ذرهٔ هدف توسعه دادند.

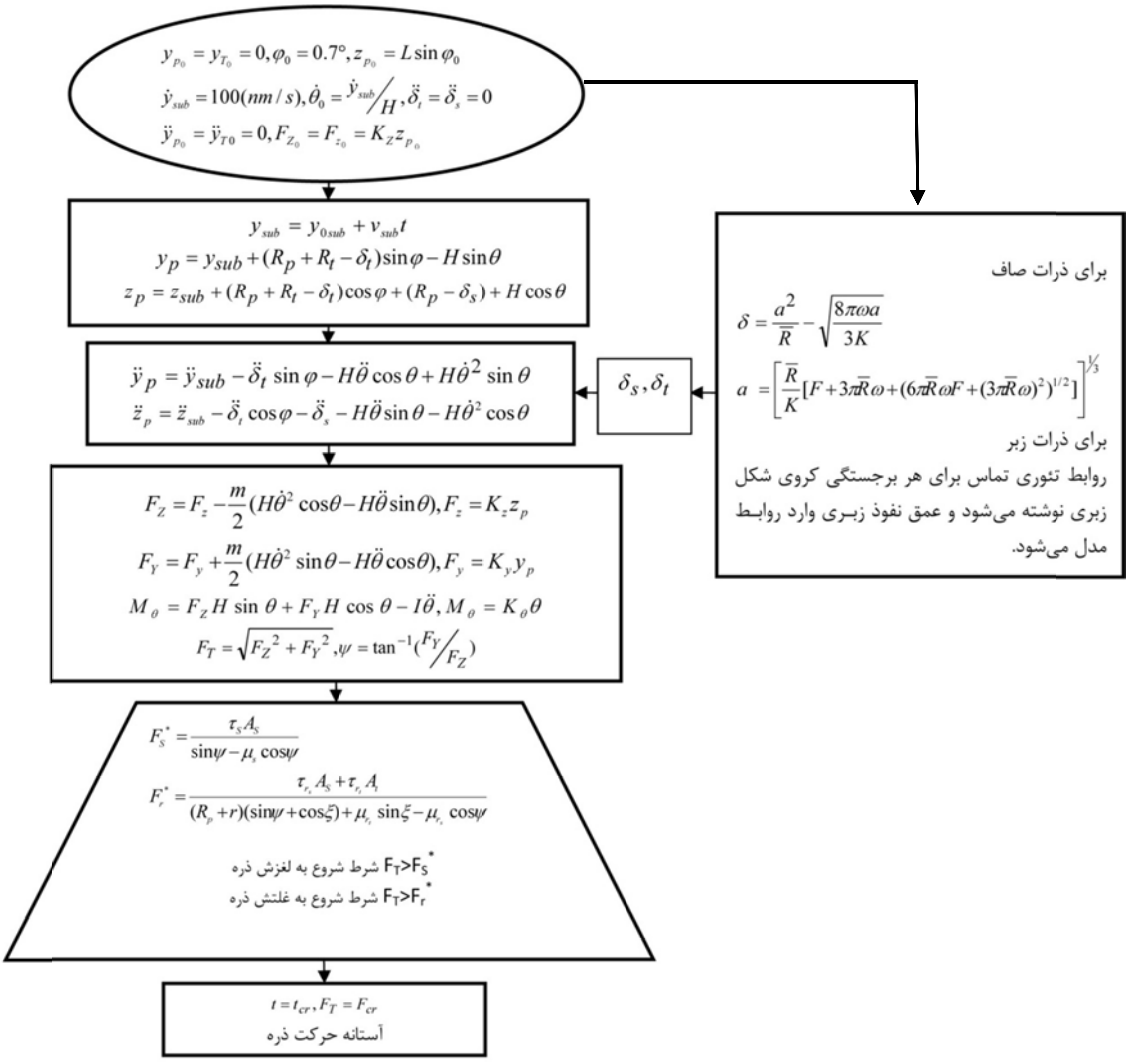
منیپولیشن ذره به‌وسیلهٔ AFM، با شروع حرکت صفحه مبنا با سرعت ثابت آغاز می‌شود که به‌موجب آن ذرهٔ چسبیده به آن نیز شروع به حرکت می‌نماید و در تماس با سوزن قرار می‌گیرد. در نتیجهٔ این حرکت، نیروهای اعمالی بر ذره و عکس‌العمل آن بر رأس سوزن پروب شروع به افزایش می‌کنند که این نیروی عکس‌العملی موجب خمش و پیچش در کانتیلور می‌گردد. با افزایش تغییر شکل کانتیلور و نیروهای عکس‌العمل وارد بر ذره، ذره شروع به حرکت بر روی صفحهٔ مبنا می‌کند.

روابط مدل دینامیکی فرآیند راندن میکرو/نانوذرات با استفاده از پروب AFM، برای ذرات کروی و استوانه‌ای‌شکل دارای سطح ایده‌آل صاف و ذرات زبر، برمبنای روابط ارائه‌شده در تحقیقات گذشته در قالب الگوریتم شکل (۳) ارائه شده است. درادامه برمبنای این الگوریتم شبیه‌سازی مقادیر نیرو و زمان بحرانی حرکت برای سلول سرطانی HT29 به‌عنوان ذرهٔ هدف در این فرآیند انجام شده است.

در معادلات ارائه‌شده در الگوریتم شکل (۳)، y_p و z_p موقعیت افقی و قائم پروب AFM و y_{sub} و v_{sub} به‌ترتیب موقعیت و سرعت حرکت سطح مبنا می‌باشند. H ارتفاع سوزن پروب و R_p و R_t نیز به‌ترتیب معرف شعاع ذرهٔ هدف و سوزن پروب که در تماس با ذره قرار می‌گیرد، می‌باشد. δ_s و δ_t به‌ترتیب تغییر شکل میان ذره – سطح مبنا و ذره – سوزن می‌باشند و از رابطهٔ تغییر شکل تئوری تماسی JKR برای ذرات کروی و با جایگزینی شعاع تماس از رابطهٔ ارائه‌شده در همین تئوری مطابق معادلهٔ ارائه‌شده در الگوریتم به‌دست می‌آیند. هم‌چنین مقدار ω معرف کار چسبندگی معادل در محیط کاری مد نظر است.

الگوریتم ارائه‌شده در شکل (۳) در حقیقت دو الگوریتم مرتبط با یکدیگر را شامل می‌شود. سمت راست شکل، شامل محاسبهٔ عمق نفوذ ذره در شرایط هندسی مختلف مانند منظور نمودن زبری را نشان می‌دهد که ورودی آن شرایط اولیه و خروجی آن مقادیر عمق نفوذ می‌باشند. سپس این مقادیر خروجی علاوه بر شرایط اولیه به‌عنوان ورودی الگوریتم اصلی منیپولیشن وارد می‌شوند. بنابراین حل معادلات مربوط به این بخش مقدم بر حل معادلات الگوریتم اصلی منیپولیشن (سمت چپ شکل) می‌باشد. در الگوریتم اصلی محاسبهٔ مقادیر نیرو و زمان بحرانی منیپولیشن نیز، پس از ارائهٔ روابط سینماتیکی و با جایگزینی مشتقات مقادیر موقعیت افقی و عمودی پروب در معادلات نیوتن-اویلر معادلات دینامیکی فرآیند حاصل می‌شوند. در معادلات دینامیکی، F_Y ، F_Z و F_T به‌ترتیب مؤلفه‌های نیروی وارد بر ذره از طرف پروب AFM یا بالعکس در راستای افقی و قائم و نیروی برآیند وارد بر ذره از طرف پروب می‌باشند. نیروی بحرانی F_{cr} و زمان بحرانی F_{cr} نیز نیروی برآیند و زمان در لحظهٔ حرکت ذره، معادل مقدار F_T در لحظهٔ غلبه بر نیروهای حدی F_s^* یا F_r^* است و تابعی از ψ زاویهٔ نیروی راندن ذره، φ زاویهٔ تماس پروب و ذره، ثابت‌های اصطکاکی μ، τ، و سطح تماس بین سوزن/ذره و ذره/صفحهٔ مبنا A_s و A_t است و شروع حرکت ذره در هر مد دینامیکی منوط به برقراری نامعادلهٔ مربوط به آن مد خواهد بود. به این ترتیب که با استفاده از روابط، مقادیر نیروی بحرانی لغزشی و غلتشی محاسبه‌شده و با مقدار نیروی برآیند مقایسه می‌شوند. در شرایطی که مقدار نیروی برآیند بر مقدار نیروی بحرانی حرکت غلبه کند، منیپولیشن آغاز می‌گردد. هم‌چنین در این معادلات θ زاویهٔ پیچش تیر مربوط به پروب در حین اعمال نیرو به ذره می‌باشد که برای استخراج موقعیت پروب در روابط سینماتیکی به‌کار می‌رود.

توضیح دقیق‌تر چگونگی توسعهٔ مدل و استخراج روابط دینامیکی فرآیند با در نظر گرفتن زبری بر روی سطح مبنا و سطح ذره به‌ترتیب در مراجع [6, 7] ارائه شده است.



شکل ۳ الگوریتم مدل دینامیک منیپولیشن میکرو/نانوذرات استوانه‌ای زبر به‌وسیلهٔ AFM

شبیه‌سازی نیرو و زمان بحرانی منیپولیشن سلول سرطانی HT29 با استفاده از AFM

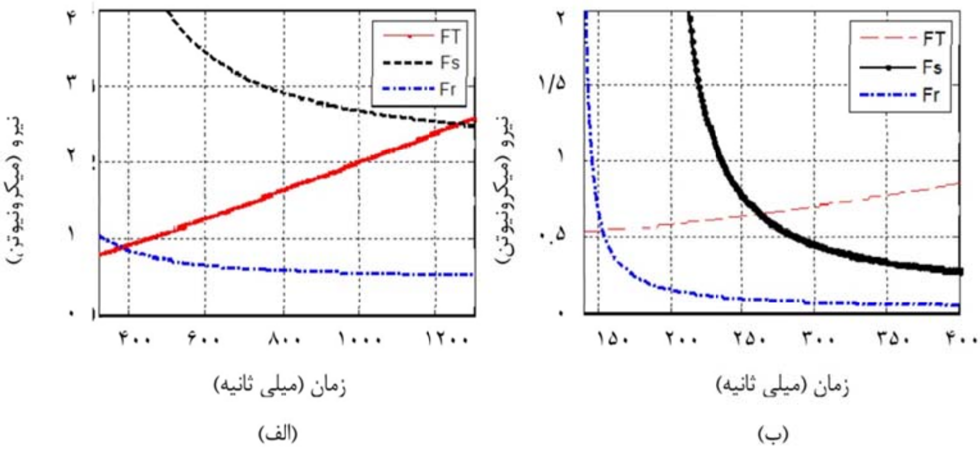
در این بخش به شبیه‌سازی مقادیر نیرو و زمان بحرانی منیپولیشن سلول سرطانی HT29 به‌صورت ذرات کروی دارای سطح صاف ایده‌آل و با در نظر گرفتن زبری برروی سطح ذره و سطح مبنا برمبنای الگوریتم شکل (۳) پرداخته شده است.

اطلاعات اصلی شامل مشخصات هندسی و خواص مکانیکی AFM و اطلاعات تریبولوژیکی بین ذره و سطح و بین ذره و سوزن و هم‌چنین شرایط اولیه در شبیه‌سازی فرآیند مشابه اطلاعات ارائه‌شده در مرجع [7] استفاده شده است. سلول سرطانی هدف نیز با استفاده از آنالیز انجام شده در بخش قبل به‌صورت کره با شعاع ۳/۱۵۸ میکرومتر فرض شده است.

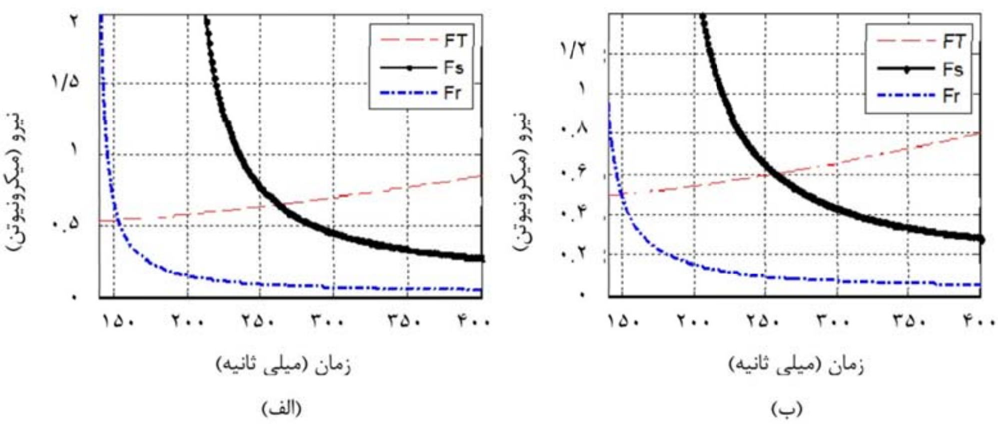
به‌منظور بررسی تأثیر درنظر گرفتن زبری برای میکرو/نانو ذرات هدف در فرآیند منیپولیش، نتایج شبیه‌سازی مقادیر نیروی برآیند و نیروی بحرانی در فرآیند منیپولیشن، برای نانوذرات کروی HT29 به شعاع مقطع ۳/۱۵۸ میکرومتر در دو حالت دارای سطح

ایده‌آل صاف و سطح دارای زبری ریز به‌صورت برجستگی‌های کروی شکل به شعاع ۱۵۳/۳ نانومتر (برمبنای مدل رامپ)، در شکل (٤) ارائه شده است.

همان‌طور که در شکل (٤) مشاهده می‌شود، در قسمت (الف)، نیروی برآیند نمودار نیروی بحرانی لغزشی را در F_{cr} = ۲/۵ (μN) و t_{cr} = ۱۲٦۰ (ms) و نمودار نیروی بحرانی غلتشی را در t_{cr} = ۳۸۰ (ms) و F_{cr} = ۰/۸۷ (μN) قطع می‌کند و در قسمت (ب)، نیروی برآیند در t_{cr} = ۲٦۲ (ms) و F_{cr} = ۰/٦۵ (μN) نمودار نیروی بحرانی لغزشی و نمودار نیروی بحرانی غلتشی را در t_{cr} = ۱۵۳ (ms) و F_{cr} = ۰/۵٤ (μN) قطع می‌کند. بنابراین با مقایسهٔ این نتایج مشاهده می‌شود که در هر دو قسمت شکل (٤)، مقدار نیروی برآیند ابتدا به مقدار نیروی بحرانی غلتشی می‌رسد و بنابراین مد دینامیکی غالب در هنگام شروع حرکت ذره، مد غلتشی است. اما مقادیر نیروی بحرانی و زمان بحرانی شروع به حرکت ذرهٔ زبر کاهش چشم‌گیری را نسبت به این مقادیر برای شکل مربوط به ذرهٔ صاف نشان می‌دهند که این امر نشان‌دهندهٔ کاهش چسبندگی در اثر درنظر گرفتن زبری سطح می‌باشد.



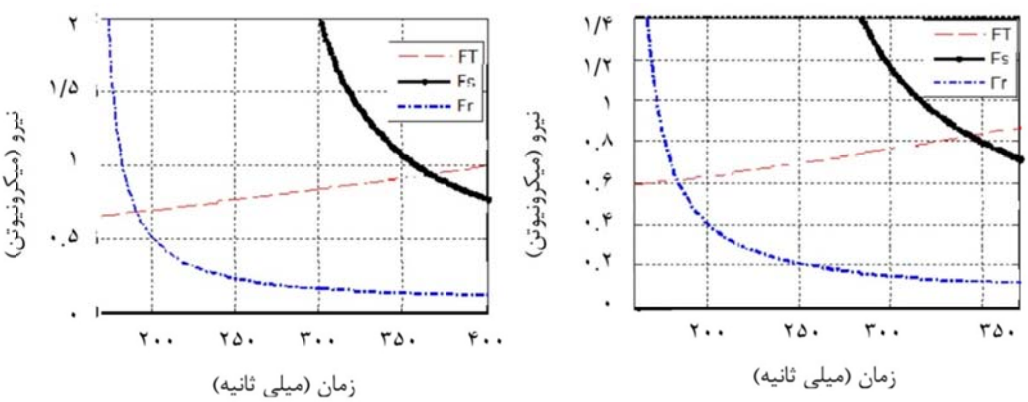
شکل ٤ مقادیر نیرو و زمان بحرانی منیپولیشن سلول سرطانی HT29 (الف) بدون در نظر گرفتن زبری بر روی سطح ذره مدل (ب) با در نظر گرفتن زبری بر روی سطح ذره بر مبنای مدل رامپ



شکل ۵ مقادیر نیرو و زمان بحرانی منیپولیشن سلول سرطانی HT29 با در نظر گرفتن زبری بر روی سطح ذره بر مبنای (الف) مدل رامپ و (ب) رابینوویچ

شکل (۵) مقادیر نیرو و زمان بحرانی منیپولیشن سلول سرطانی HT29 را با در نظر گرفتن زبری بر روی سطح ذره بر مبنای مدل زبری رامپ (الف) و رابینوویچ (ب) و با استفاده از مقادیر شعاع و ارتفاع برجستگی ذره، به‌دست آمده در بخش قبل نشان می‌دهد. برمبنای نتایج شبیه‌سازی‌ها، مقادیر زمان و نیروی بحرانی منیپولیشن سلول سرطانی HT29 با در نظر گرفتن زبری بر روی سطح ذره هدف با استفاده از مدل زبری رامپ در مد لغزشی و غلتشی به‌ترتیب $t_{cr}=۲٦۲(ms)$ و $F_{cr}=۰/٦۵\ (\mu N)$ و همچنین $t_{cr}=۱۵۳(ms)$ و $F_{cr}=۰/۵٤\ (\mu N)$ و باکارگیری مدل زبری رابینوویچ و در مد لغزشی برابر با $t_{cr}=۲۵۷\ (ms)$ و $F_{cr}=۰/٦\ (\mu N)$ و در مد غلتشی $t_{cr}=۱۵۰(ms)$ و $F_{cr}=۰/۵\ (\mu N)$ به‌دست آمده است.

شکل (٦) نیز مقادیر نیرو و زمان بحرانی منیپولیشن سلول سرطانی HT29 با در نظر گرفتن زبری برروی سطح مبنا، برمبنای مدل زبری رامپ (الف) و رابینوویچ (ب) و بااستفاده از مقادیر عددی زبری به‌دست آمده در بخش قبل برای سطح مبنا را نشان می‌دهند. مقادیر زمان و نیروی بحرانی منیپولیشن سلول سرطانی HT29 با در نظر گرفتن زبری برروی سطح مبنا به‌دست آمده در شبیه‌سازی‌ها با استفاده از مدل زبری رامپ در مد لغزشی $t_{cr}=۳٦۷(ms)$ و $F_{cr}=۰/۹۳\ (\mu N)$ و در مد غلتشی $t_{cr}=۱۹۱(ms)$ و $F_{cr}=۰/٦۷\ (\mu N)$ و با استفاده از مدل زبری رابینوویچ و در مد لغزشی برابر با $t_{cr}=۳٤۳\ (ms)$ و $F_{cr}=۰/۸۲\ (\mu N)$ و در مد غلتشی $t_{cr}=۱۸٤(ms)$ و $F_{cr}=۰/٦۲\ (\mu N)$ می‌باشند. در نتایج به‌دست آمده در شکل‌های (٦ و ۵) نیز مقدار نیروی برآیند وارد بر ذرهٔ هدف توسط پروب AFM در هر دو حالت شبیه‌سازی و با در نظر گرفتن زبری، ابتدا به مقدار نیروی بحرانی منیپولیشن در مد غلتشی و سپس به مقدار نیروی بحرانی لغزشی می‌رسد. به این ترتیب شروع به حرکت ذره با غلتش ذره برروی سطح مبنا تأیید می‌شود. هم‌چنین مقادیر نیرو و زمان بحرانی منیپولیشن با درنظر گرفتن زبری برمبنای مدل رابینوویچ کمتر از این مقادیر برمبنای مدل رامپ به‌دست می‌آید. این امر باتوجه به آنکه در مدل رابینوویچ علاوه بر تأثیر ارتفاع زبری‌ها، پهنای آنها نیز در توصیف از زبری در مقیاس نانو درنظر گرفته شده، قابل توجیه است.



(الف) (ب)

شکل ٦ مقادیر نیرو و زمان بحرانی منیپولیشن سلول سرطانی HT29 با در نظر گرفتن زبری بر روی سطح مبنا برمبنای (الف) مدل رامپ و (ب) رابینوویچ

بحث و نتیجه‌گیری

قابلیت‌های ویژهٔ میکروسکوپ نیروی اتمی در انجام وظایف مختلف هم‌چون جابه‌جایی و مونتاژ در ابعاد میکرو و نانو با اهداف متفاوت و در شرایط محیطی مختلف خلأ، هوا و محیط مایع بیولوژیکی و فیزیولوژیکی، منجر به رشد سریع کاربرد این دستگاه در حوزه‌های متفاوت تحقیق و صنعت شده است.

مدل‌سازی و شبیه‌سازی دینامیکی فرآیند راندن برروی سطح با استفاده از AFM، گام بسیار مهمی در شناخت و کنترل دقیق این فرآیند می‌باشد. چگونگی اجرای فرآیند منیپولیشن و کنترل دقیق آن برمبنای شناخت تأثیر پارامترهای متفاوت مستقل فرآیند بر پارامترهای اساسی خروجی فرآیند که از جمله مهم‌ترین آنها نیرو و زمان بحرانی فرآیند می‌باشد، ممکن می‌شود. در این تحقیق به بررسی و شبیه‌سازی فرآیند منیپولیشن سلول سرطانی HT29 با استفاده از AFM پرداخته شده است. برای این منظور ابتدا آنالیز زبری سطح سلول سرطانی HT29 با استفاده از AFM انجام شده سپس با به‌کارگیری اطلاعات عددی زبری به‌دست آمده از تصاویر توپوگرافی سطح این سلول به شبیه‌سازی مقادیر نیرو و زمان بحرانی منیپولیشن بر این مبنا پرداخته شده است.

مقادیر عددی شعاع و ارتفاع زبری سطح طی آنالیز زبری انجام‌شده با استفاده از نرم‌افزار DME برای سطح سلول سرطانی HT29 به‌ترتیب ۱۵۳/۳ و ۱۸۸/۵ نانومتر و برای سطح مبنا نیز به‌ترتیب ۱۲۹/۲ و ۱۵۸/۹ نانومتر به‌دست آمد.

با توجه به مقادیر عددی نیرو و زمان بحرانی منیپولیشن به‌دست آمده در کلیهٔ شبیه‌سازی‌ها، شروع به حرکت ذره در دو حالت در نظر گرفتن زبری بر روی سطح مبنا و سطح ذره و هم‌چنین بدون در نظر گرفتن زبری برای سطح ذره و سطح مبنا، در مد غلتشی و به عبارت دیگر با غلتش ذره برروی سطح مبنا می‌باشد.

این امر مطابق نتایج تحقیقات قبلی است که مد دینامیکی شروع به حرکت ذرات دارای ابعاد در حدود میکرو را مد غلتشی اعلام می‌کند.

مطابق نتایج به‌دست آمده در شبیه‌سازی‌ها، با منظور نمودن زبری سطح ریز برروی سطح نانوذرات کروی سلول سرطانی HT29 با شعاع مقطع ۱۵۸/۳ میکرومتر، مقادیر بحرانی نیرو و زمان در مد لغزشی منیپولیشن به‌ترتیب ٪۷٤ و٪ ۷۹ و در مد غلتشی به‌ترتیب ٪۳/٤٥ و ٪ ۵۹/۷ کاهش را نشان می‌دهد؛ که این امر نشانگر کاهش قابل‌ملاحظهٔ نیروی چسبندگی به‌واسطهٔ کاهش سطح تماس مؤثر در تماس میان ذره و سطح مبنا با منظور نمودن زبری سطح می‌باشد.

هم‌چنین اختلاف میان نیرو و زمان‌های بحرانی در دو مد دینامیکی لغزش و غلتش با منظور نمودن زبری سطح برای ذره کاهش می‌یابد و بیانگر این امر است که با افزایش زبری ذره، احتمال وقوع لغزش به‌جای غلتش افزایش می‌یابد.

هم‌چنین برمبنای نتایج شبیه‌سازی‌های انجام‌شده در بخش قبل، مقادیر زمان و نیروی بحرانی منیپولیشن سلول سرطانی HT29 با در نظر گرفتن زبری برروی سطح ذره هدف و یا سطح مبنا با تحلیل زبری برمبنای مدل رابینوویچ ۸ درصد نسبت به مقادیر به‌دست آمده در این شرایط و با تعریف زبری برمبنای مدل رامپ کمتر پیش‌بینی می‌شود. این امر نیز با توجه به دقیق‌تر بودن هندسهٔ توصیف زبری در مدل زبری رابینوویچ نسبت به مدل رامپ قابل توجیه است و بنابراین مقادیر دقیق‌تری را نتیجه می‌دهد.

بنابراین شرایط هندسی سطح میکرو/نانو ذرهٔ هدف از جمله هندسه زبری روی سطح آن در رفتار دینامیکی آن در فرآیند منیپولیشن و مقادیر نیرو و زمان بحرانی منیپولیشن، بسیار تأثیرگذار است و لحاظ نمودن این پارامترها در مدل دینامیکی دقیق فرآیند ضروری می‌باشد. برای دقیق‌تر نمودن مدل ارائه‌شده در این پژوهش می‌توان تأثیر زبری سوزن را نیز در

مدل‌سازی وارد نمود و هم‌چنین مدل‌سازی و شبیه‌سازی‌ها را برای سلول سرطانی HT29 با به‌کارگیری مدل تماسی اجسام نرم که برای این ذرات مناسب‌تر می‌باشند نیز انجام داد و با نتایج حاصل از به‌کارگیری سایر مدل‌های تماسی مقایسه نمود. هم‌چنین می‌توان شبیه‌سازی‌ها را برای ذرات از جنس‌های دیگر و در محیط‌های کاری دیگر AFM نیز انجام داد تا تأثیر این عوامل نیز درنظر گرفته شود.

فهرست علائم

A_H	ثابت هماکر
m'	تعداد نقاط داده‌ها
r	شعاع برجستگی‌های سطح
Rms	ریشه میانگین مربعات زبری
R	شعاع ذرهٔ کروی
s_a	متوسط زبری
s_{sk}	کجی زبری سطح ارزیابی‌شده
s_{ku}	تیزی پروفیل ارزیابی‌شده
s_z, s_t, s_y	ارتفاع قله – قله زبری
s_q	ریشهٔ میانگین مربعات زبری
s_v	ماکزیمم عمق فرورفتگی‌های سطح یا همان دره‌ها
s_p	ماکزیمم ارتفاع برآمدگی یا همان قله‌ها
y_{max}	ماکزیمم ارتفاع برجستگی‌ها کروی‌شکل زبری
z_0	فاصله‌ی جدایش
z_i	انحراف ارتفاع نقطهٔ i ام از سطح میانگین

مراجع

1. D Antonio, P., Lasalvia, M., Perna, G., & Capozzi, V., "Scale-independent roughness value of cell membranes studied by means of AFM technique", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, Vol. 1818(12), pp. 3141-3148, (2012).
2. Guduru, R. "In situ AFM Imaging of Nanoparticle-Cellular Membrane Interaction for a Drug Delivery Study", Master of Science thesis in biomedical engineering. Florida International University, (2011).
3. Mege, J. L., Capo, C., Benoliel, A. M., Foa, C., Galindo, R., & Bongrand, P., "Quantification of cell surface roughness; a method for studying cell mechanical and adhesive properties", *Journal of theoretical biology*,Vol. 119(2), pp. 147-160, (1986).
4. Kaul-Ghanekar, R., Singh, S., Mamgain, H., Jalota-Badhwar, A., Paknikar, K. M., & Chattopadhyay, S., "Tumor suppressor protein SMAR1 modulates the roughness of cell surface: combined AFM and SEM study", *BMC Cancer*, Vol. 9(1), pp. 1-12, (2009).
5. Korayem, M.H. & Zakeri, M., "Sensitivity analysis of nanoparticles pushing critical conditions in 2-D controlled nanomanipulation based on AFM", *J Adv. Manuf. Technol, Vol.* 41, pp. 714–726, (2009).
6. Korayem, M.H. & Zakeri, M., "Dynamic modeling of manipulation of micro/nanoparticles on rough surfaces", *J Applied Surface Science,* Vol. 257(15), pp. 6503–6513, (2011).
7. Korayem, M.H., Badkoobeh Hezaveh, H. and Taheri, M., "Dynamic Modeling and Simulation of Rough Cylindrical Micro/Nanoparticle Manipulation with Atomic Force Microscopy", *Microscopy and Microanalysis*, Vol. 20 (6), pp. 1692-1707, (2014).

8. Sitti, M. & Hashimoto, H., "Force controlled pushing of nanoparticles: Modeling and experiments", *In International Conference of Advanced Intelligent Mechatronics*, pp. 13-20, (1999) Sep 19, Atlanta, GA.
9. Korayem, M.H., Motaghi, A. and Zakeri, M., "Dynamic modeling of submerged nanoparticle pushing based on atomic force microscopy in liquid medium", *Journal of Nanoparticle Research*, Vol. 13(10), 5009-5019, (2011).
10. Korayem, M.H., and Geramizadeh, M., "DNA Manipulation in Biological Liquid Environment Based on Atomic Force Microscopy", *Nanoscience and Nanotechnology*, Vol. 2(4), 109-115, (2012).
11. Beach, E.R., Tormoen, G.W., Drelich, J. and Han, R., "Pull-off Force Measurements between Rough Surfaces by Atomic Force Microscopy", *Journal of Colloid and Interface Science 247*, pp. 84–99, (2002).
12. Rabinovich, Y.I., Adler, J.J., Ata, A., Singh, R.K. & Moudgil, B.M. (2000a). Adhesion between nanoscale rough surfaces: I. Role of asperity geometry. J Colloid Interface Sci 232, 10–16, (2000).
13. Rabinovich, Y.I., Adler, J.J., Ata, A., Singh, R.K. & Moudgil, B.M. (2000b). Adhesion between nanoscale rough surfaces: II. Measurement and comparison with theory. J Colloid Interface Sci 232, 17–24, (2000).